

# Nextera™ DNA Exome

Der einfache Workflow optimiert die Bibliotheksvorbereitung sowie die Exomanreicherung und beschleunigt so die Sequenzierung des menschlichen Exoms.

## Vorteile

- **Flexibilität für unterschiedliche Studiendesigns**  
Die optimierte Chemie ermöglicht geringe Eingabemengen.
- **Effiziente Bibliotheksvorbereitung und Exomanreicherung**  
Der schnelle, automatisierungsfähige Workflow dauert weniger als zwei Tage, bei einem manuellen Aufwand von nur drei Stunden.
- **Genaue Varianten-Calls**  
Hohe Abdeckung und On-Target-Sequenzierung ergeben präzise Daten.
- **Integrierte Workflow-Lösung**  
Der umfassende Workflow optimiert die Exomsequenzierung von der Bibliotheksvorbereitung bis zur Datenanalyse.

**Tabelle 1: Exominhalte mit Nextera DNA Exome und TruSeq DNA Exome**

Abdeckung	Nextera DNA Exome oder TruSeq DNA Exome
Größe des Zielbereichs	45 Mb
Anzahl an Ziellexons	214.405
Inhalt des Zielbereichs	Codierende Exons
Anteil der Abdeckung des Exoms (nach Datenbank)	
RefSeq <sup>a</sup>	99,45 %
CCDS <sup>b</sup>	98,83 %
ENSEMBL <sup>c</sup>	99,68 %
GENCODE v19 <sup>d</sup>	99,68 %

- a. RefSeq - NCBI Reference Sequence Database. [www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/). Abgerufen: 11. Februar 2015.
- b. CCDS - Consensus CDS (CCDS) Database. [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS/CcidsBrowse.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS/CcidsBrowse.cgi). Abgerufen: 11. Februar 2015.
- c. ENSEMBL - Ensembl Genome Browser. [www.ensembl.org/index.html](http://www.ensembl.org/index.html). Abgerufen: 11. Februar 2015.
- d. GENCODE - GENCODE-Projekt: Encyclopedia of genes and gene variants. [www.gencodegenes.org/](http://www.gencodegenes.org/). Abgerufen: 11. Februar 2015.

## Einleitung

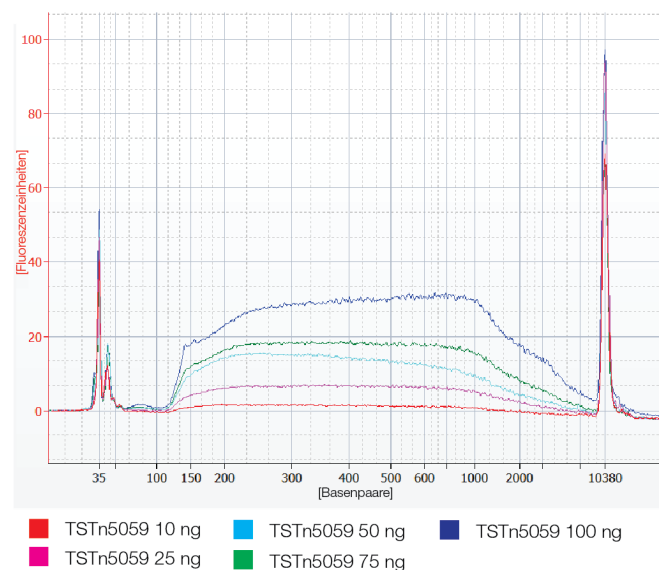
Die Exomsequenzierung ist wissenschaftlich als leistungsstarke Methode zur Erkennung von Varianten anerkannt, die ursächlich für genetisch bedingte Erkrankungen sein können.<sup>1-3</sup> Nextera DNA Exome, früher als TruSeq™ Rapid Exome Kit im Handel, bietet einen schnellen Exomsequenzierungs-Workflow, der die Bibliotheksvorbereitung und Exomanreicherung in einem einzigen, optimierten Prozess vereint, für den keine Ausrüstung zum Einsatz von DNA-Scheren erforderlich ist.

## Flexibilität für unterschiedliche Studiendesigns

Nextera DNA Exome ist für eine DNA-Menge von 50 ng optimiert. Die verbesserte Transposonchemie reduziert Verzerrungen und ermöglicht eine einheitliche Bibliotheksvorbereitung und Exomanreicherung für unterschiedliche DNA-Mengen (Abbildung 1). Das Transposonenzym ist überaus tolerant gegenüber variierenden DNA-Eingabemengen. Geringfügige Abweichungen bei der DNA-Quantifizierung werden ausgeglichen. Das Kit ermöglicht das Bibliotheks-Pooling vor der Anreicherung, damit Labors abhängig von dem zu verarbeiteten Probenvolumen bis zu 12 Proben gleichzeitig durchlaufen lassen können. Dank eines automatisierungsfähigen Workflows vereinfacht und optimiert Nextera DNA Exome Laborprozesse noch weiter.

## Fokussierter exonischer Inhalt

Nextera DNA Exome ist im Hinblick auf eine einheitliche und spezifische Abdeckung von 45 Mb exonischer Inhalte optimiert. Das Sonden-Set ist für die Anreicherung von 214.405 Exons konzipiert (Tabelle 2). Diese Kombination aus fokussiertem Design sowie gleichmäßiger und spezifischer Anreicherung bietet eine umfassende Exomsequenzierung und eine zuverlässige Identifikation echter, codierender Varianten.



**Abbildung 1: Einheitliche Target-Erfassung für variierende Eingabemengen:**

Die verbesserte Transposonchemie weist eine große Toleranz gegenüber variierenden DNA-Eingabemengen auf, wodurch Verzerrungen vermieden und einheitliche Ergebnisse erzielt werden. Bibliotheken wurden auf einem Bioanalyzer-Gerät bewertet.

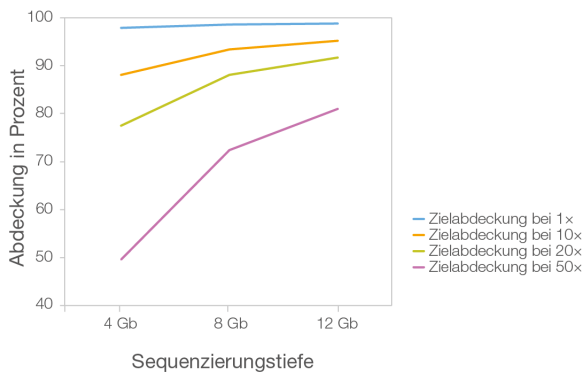
## Effiziente Bibliotheksvorbereitung und Exomanreicherung

Mit Nextera DNA Exome dauern Bibliotheksvorbereitung und Exomanreicherung weniger als zwei Tage bei einem manuellen Aufwand von nur drei Stunden (Abbildung 3). Die Bibliotheksvorbereitung beginnt mit der Target-Erfassung, bei der genomische DNA gleichzeitig fragmentiert und mit Adaptoren markiert wird (Abbildung 3A). Anschließend wird die DNA amplifiziert und es werden per PCR Sequenzierungsindizes hinzugefügt (Abbildung 3B). Bis zu 12 Bibliotheken werden in einem Pool zusammengefasst. Der Bibliothekspool wird konzentriert und die Bibliotheken werden in einzelsträngige DNA denaturiert (Abbildung 3C). Mit Biotin gekennzeichnete, für bestimmte Zielregionen spezifische Sonden werden für zwei Hybridisierungsdurchgänge verwendet (Abbildung 3D und 3E). Der Pool wird für die gewünschten Regionen angereichert, indem Streptavidin-Beads hinzugefügt werden, die sich an die biotinylierten Sonden binden. An die Streptavidin-Beads gebundene biotinylierte DNA-Fragmente werden magnetisch aus der Lösung gezogen. Die angereicherten DNA-Fragmente werden von den Beads eluiert und weiter per PCR amplifiziert (Abbildung 3F). Die amplifizierten Bibliotheken werden gereinigt und sind bereit zur Sequenzierung (Abbildung 3G).

## Genaue Varianten-Calls

Mit Nextera DNA Exome vorbereitete Bibliotheken bieten eine hohe Abdeckung mit 85 % Reads bei 20-facher Tiefe (Abbildung 2). Diese hohe Abdeckung ermöglicht präzise Varianten-Calls. Über 99,58 % der Varianten-Calls mit Nextera DNA Exome entsprechen den Standardreferenzdaten in der Datenbank des National Institute of Standards and Technology (NIST) (Abbildung 4).<sup>5,6</sup>

Nextera DNA Exome liefert durchschnittlich 75 % der On-Target-Sequenzierungsreads (Abbildung 6). Dieser hohe On-Target-Prozentsatz erfordert weniger Sequenzierungszyklen, um die gewünschten Abdeckungsstufen zu erreichen, garantiert aber trotzdem eine einheitliche Abdeckung für höchst zuverlässige Ergebnisse. Er ermöglicht außerdem eine Sequenzierung von noch mehr Exomen pro Lauf, sodass Labors noch größeren Nutzen aus dem ihnen zur Verfügung stehenden Budget ziehen können (Tabelle 2).

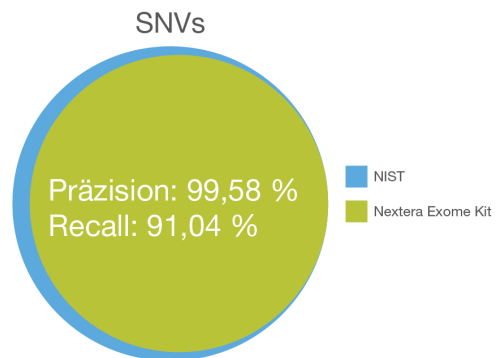


**Abbildung 2: Abdeckungseffizienz bei unterschiedlicher Tiefe:** Nextera DNA Exome bietet eine außerordentliche Abdeckung bei unterschiedlicher Sequenzierungstiefe. Bei bis zu 20-facher Tiefe werden mehr als 80 % der Ziele abgedeckt.

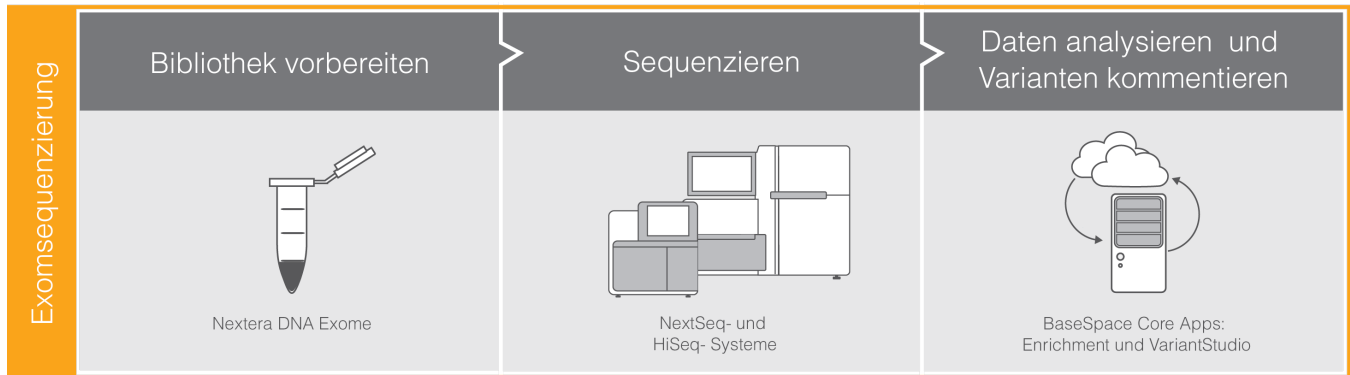


\* Illumina empfiehlt, bei Bedarf an diesem Punkt abzubrechen und den Workflow am Tag 2 wieder aufzunehmen.

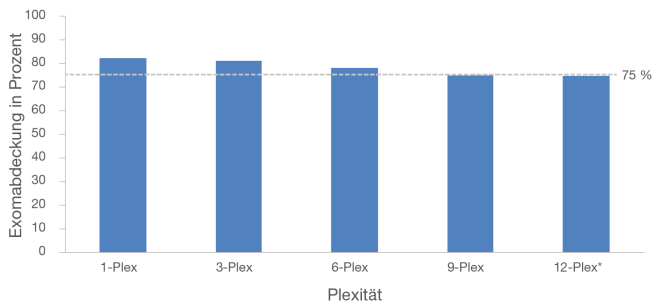
**Abbildung 3: Effizienter und schneller Workflow:** Mit Nextera DNA Exome dauern Bibliotheksvorbereitung und Exomanreicherung weniger als zwei Tage. Ein sicherer Stopp-Punkt sorgt für größere Flexibilität.



**Abbildung 4: Hohe Korrelation mit NIST-Datenbank:** Die mit Nextera DNA Exome durchgeführten SNV-Calls (Single Nucleotide Variant, Einzelnukleotidvariante) weisen eine hohe Übereinstimmung mit Standardreferenzdaten auf. Die DNA-Probe NA12878 des Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH) wurde auf eine 100-fache Abdeckungstiefe sequenziert. **Präzision** wird als die **Wahrscheinlichkeit definiert, dass ein Varianten-Call korrekt ist**. **Recall** wird als die **Wahrscheinlichkeit des Calls einer validierten Variante definiert**.



**Abbildung 5: Exomsequenzierungs-Workflow:** Nextera DNA Exome ist Teil eines integrierten Exomsequenzierungs-Workflows, der die Bibliotheksvorbereitung, die Sequenzierung und die Datenanalyse umfasst.



**Abbildung 6: On-Target-Anreicherung:** Nextera DNA Exome liefert durchschnittlich 75 % der On-Target-Sequenzierungsreads bei 4 Gb je Exom und ermöglicht so eine effiziente, kostengünstige Sequenzierung.

**Tabelle 2: Vergleich für Durchsatz mit Nextera DNA Exome<sup>a</sup>**

Sequenzierungssystem	Anzahl der Exome pro Lauf bei 50x	Anzahl der Exome pro Lauf bei 100x
<b>MiSeq-Serie</b>	1	n. z.
<b>NextSeq-Serie</b>		
Fließzelle mit mittlerer Leistung	3	2
Fließzelle mit hoher Leistung	12	6
<b>HiSeq-Serie</b>		
HiSeq 2500-System Schnelllauf-Modus (zwei Fließzellen)	24	12
HiSeq 2500-System Hochleistungs-Modus (zwei Fließzellen)	156	78
HiSeq 3000-System	96	48
HiSeq 4000-System (zwei Fließzellen)	192	96

a. Die geschätzte Anzahl der pro Lauf sequenzierten Exome wird mit einer mittleren Abdeckung von 50x bzw. 100x berechnet. Illumina empfiehlt bei der Verwendung von Nextera DNA Exome für alle Sequenzierer eine Read-Länge von 2 x 75 bp.

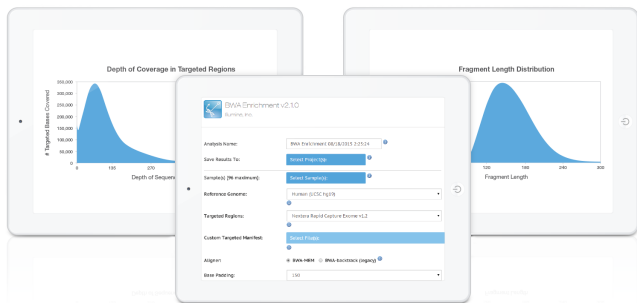
### Integrierter Sequenzierungs-Workflow

Nextera DNA Exome ist Teil einer zusammenhängenden, unterstützten Lösung, die Forscher durch den gesamten Prozess von der Bibliotheksvorbereitung bis zur Datenanalyse führt (Abbildung 5). Das Kit kombiniert Bibliotheksvorbereitung und Exomanreicherung, daher müssen keine Indizes, Probenreinigungs-Beads oder andere zusätzliche Materialien angeschafft werden. Alle Komponenten von Nextera DNA Exome wurden zusammen entwickelt, optimiert und analytisch validiert. Dadurch ist die Überprüfung einer Vielzahl unterschiedlicher Komponenten überflüssig. Wissenschaftliche Experten von Illumina bieten eine einzige Anlaufstelle für technischen und Vor-Ort-Support in jeder Phase des Workflows. Durch den Beitritt zur Illumina-Community können Forscher die Expertise des Illumina-Support-Teams nutzen und mit dem großen Netzwerk an Forschern zusammenarbeiten, die die Technologie von Illumina verwenden.

Nextera DNA Exome ist kompatibel mit den Sequenzierungssystemen der Serien MiSeq™, NextSeq™, HiSeq™ und NovaSeq™. Sequenzierungssysteme von Illumina verwenden die SBS-Methode (Sequencing by Synthesis), mit der mehr als 90 % der Sequenzierungsdaten weltweit generiert werden.\* Die Sequenzierungsdaten werden automatisch vom Illumina-System an BaseSpace® Sequence Hub, die Computerumgebung für Genomik von Illumina, übertragen. Durch BaseSpace Sequence Hub werden Datenanalyse und biologische Interpretation vereinfacht, wodurch dem typischen Analyse-Workflow ein Großteil seiner Komplexität genommen wird. BaseSpace Sequence Hub bietet ein etabliertes Ökosystem von integrierten Datenanalysetools für Biologen. Bei BaseSpace Apps wurden die von Experten bevorzugten Analysetools in einer intuitiven, benutzerfreundlichen Oberfläche vereint, sodass Forscher auch ohne Erfahrung im Bereich Bioinformatik auf bewährte Analysepipelines zugreifen können (Abbildung 7). Forscher können die Exomdaten mit der BWA Enrichment App, die die BWA/GATK-Methode (Industriestandard) verwendet, oder mit der Isaac™ Enrichment App analysieren, die die schnelle und genaue Illumina-Pipeline nutzt.<sup>6</sup>

Für Biologen, die die genetische Basis von Krankheiten untersuchen, bietet die VariantStudio App eine Identifizierung und funktionale Interpretation von mit Krankheiten assoziierten Einzelnukleotidvarianten (SNVs) sowie Insertionen und Deletionen (Indels). Forscher können daraus resultierende Varianten schnell filtern und isolieren, um Sequenzierungsdaten mit biologischem Kontext anzureichern. Signifikante Ergebnisse werden in kurze, prägnante Berichte exportiert. Mit der VariantStudio App können Forscher biologische Signifikanz in wenigen einfachen Schritten entdecken.

\* Archivierte Datenberechnungen. Illumina, Inc., 2015.



**Abbildung 7: Vereinfachte Datenanalyse mit BaseSpace Apps:** Sequenzierungsdaten von Nextera DNA Exome können einfach und sicher in den BaseSpace Sequence Hub hochgeladen und mit der BWA Enrichment App analysiert werden. Die Ergebnisse werden in einfach lesbaren Formaten bereitgestellt.

### Vergleich der Exomsequenzierungsleistung

Illumina bietet zwei integrierte Workflow-Lösungen zur Exomsequenzierung. Außerdem stehen Workflows zur Verfügung, die die Illumina-Bibliotheksvorbereitung mit TruSeq DNA Exome oder Nextera DNA Exome und die Exomanreicherung mithilfe von xGen® Universal Blockers, xGen Lockdown Reagents und xGen Exome Research Panel v1.0, erhältlich von IDT, miteinander kombinieren (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Vergleich der Exom-Workflowleistung**

Kategorie	TruSeq-xGen <sup>a</sup>	Nextera-xGen <sup>a</sup>	TruSeq Exome	Nextera Exome
DNA-Zugabe	100 ng	50 ng	100 ng	50 ng
Probentypen	DNA	DNA	DNA und FFPE	DNA
Manueller Aufwand	5 Stunden	2 Stunden	6 Stunden	3 Stunden
Assay-Zeit insgesamt	2,5 Tage	2 Tage	2,5 Tage	2 Tage
Hybridisierungszeit	4 Stunden	4 Stunden	16 Stunden	2 Stunden
On-Target %	> 91 %	> 92 %	> 80 %	> 75 %
% Abdeckung bei 20x <sup>b</sup>	> 95 %	> 85 %	> 90 %	> 85 %

- a. Die Angaben zu den Illumina-IDT-Exomanreicherungs-Workflows basieren auf vorläufigen Daten des BaseSpace Sequence Hub.
- b. Die Angaben zur Abdeckung bei 20x wurden für TruSeq-xGen- und Nextera-xGen-Kits mit 3,5-Gb-Abdeckung ermittelt. Die Angaben zur Abdeckung bei 20x wurden für TruSeq DNA Exome und Nextera DNA Exome mit 8-Gb-Abdeckung ermittelt.

### Zusammenfassung

Nextera DNA Exome bietet eine einfache, optimierte Methode zur Identifizierung und Analyse von codierenden Varianten, die eine außerordentliche Datengenauigkeit gewährleistet. Der schnelle Bibliotheksvorbereitungs- und Exomanreicherungs-Workflow liefert in weniger als zwei Tagen sequenzierungsfähige Bibliotheken und bietet eine flexible Projektplanung abhängig vom Probenvolumen. Als Teil eines umfassenden Workflows aus führender Sequenzierungstechnologie und anwenderfreundlichen Analysetools ermöglicht Nextera DNA Exome Forschern die effiziente und kostengünstige Exomsequenzierung.

### Weitere Informationen

Weitere Informationen zur Exomsequenzierung finden Sie unter [www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing/targeted-resequencing/exome-sequencing.html](http://www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing/targeted-resequencing/exome-sequencing.html).

### Bestellinformationen

Produkt	Katalog-Nr.
Nextera Exome Kit (24 Proben)	20020616
Nextera Exome Kit (96 Proben)	20020617

### Quellen

- Litchfield K, Summersgill B, Yost S, et al. Whole-exome sequencing reveals the mutational spectrum of testicular germ cell tumours. *Nat Commun* 2015;6:5973.
- Srivastava S, Cohen JS, Vernon H, et al. Clinical whole exome sequencing in child neurology practice. *Ann Neurol*. 2014;76:473–483.
- Worthey EA, Mayer AN, Syverson GD, et al. Making a definitive diagnosis: successful clinical application of whole exome sequencing in a child with intractable inflammatory bowel disease. *Genet Med*. 2011;13:255–262.
- Standardreferenzdaten ([www.nist.gov/srd](http://www.nist.gov/srd)). Abgerufen: 11. Februar 2015.
- Genome in a Bottle Consortium | Advances in Biological and Medical Measurement Science ([sites.stanford.edu/abms/giab](http://sites.stanford.edu/abms/giab)). Abgerufen: 20. Februar 2015.
- Raczky C, Petrovski R, Saunders CT, et al. Isaac: ultrafast whole-genome secondary analysis on Illumina sequencing platforms. *Bioinformatics*. 2013;29:2041–2043.